

Marka Mikrosatelit sebagai Alternatif Uji BUSS dalam Perlindungan Varietas Tanamam Padi

Sugiono Moeljopawiro

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975, 8316897; Faks. (0251) 8338820; E-mail: sugionom@indo.net.id

Diajukan: 2 Desember 2009; Diterima: 27 April 2010

ABSTRACT

The Use of Microsatellite (Simple Sequence Repeat/SSR) Markers in Rice as an Alternative of DUS Test in Plant Variety Protection. This study was conducted at the Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development to seek the feasibility of using SSR markers for DUS testing in rice variety. Released variety Fatmawati together with seven other reference varieties were analyzed using genetic analyzer for their variability, ten SSR markers were used. Hundred and twenty five alleles located on chromosomes 1, 2, 5, 6, 7, 10, and 11 were detected in eight varieties studied, where the number of alleles ranging from 6 (BPC) to 33 (Fatmawati), with the predominant markers such as RM11 on Fatmawati, Maros, Barumun, Gilirang, and Memberamo varieties, RM237 on Cisadane and BP630 varieties, and RM133 and RM287 markers on BPC variety. The genetic distance-based results in the unrooted neighbor-joining tree revealed that the eight varieties as well as their populations clustered separately. Genetic variability within each variety indicated that these varieties were still in higher degree of heterogeneity. This demonstrated the power of SSR marker in differentiating varieties as well as population within variety, which, therefore, SSR marker could be recommended in plant variety protection.

Keywords: Rice varieties, microsatellite markers, DUS Test, plant variety protection.

ABSTRAK

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian untuk mencari kemungkinan penggunaan marka mikrosatelit untuk uji BUSS pada varietas padi. Varietas padi Fatmawati dan tujuh varietas pembandingnya dianalisis keragamannya menggunakan *genetic analyzer* dengan sepuluh marka mikrosatelit. Terdapat seratus dua puluh lima alel pada kromosom 1, 2, 5, 6, 7, 10, dan 11 pada delapan varietas padi yang diuji, dengan kisaran alel dari 6 (BPC) sampai 33 (Fatmawati), dengan marka-marka utama RM11 pada varietas Fatmawati, Maros, Barumun, Gilirang, dan Memberamo, RM237 pada Cisadane dan BP630 varieties, serta marka RM133 dan RM287 pada varietas BPC. Berdasarkan jarak genetiknya dalam pohon kekerabatan, kedelapan varietas dan populasinya mengelompok

secara terpisah. Keragaman genetik dalam setiap varietas menunjukkan bahwa varietas tersebut masih memiliki heterogenitas yang tinggi. Hal ini menunjukkan kemampuan marka mikrosatelit dalam membedakan varietas maupun populasi dalam varietas, sehingga dapat direkomendasikan untuk digunakan dalam perlindungan varietas tanaman.

Kata kunci: Varietas tanaman padi, marka mikrosatelit, perlindungan varietas tanaman, uji BUSS.

PENDAHULUAN

BUSS (Baru Unik Seragam dan Stabil) merupakan persyaratan utama dalam perlindungan varietas tanaman yang harus dievaluasi melalui uji substantif, untuk membuktikan sifat kebaruan, keunikan, keseragaman, dan kestabilan dari varietas yang dimintakan hak perlindungan varietas tanamannya. Selama ini pembedaan varietas baru dengan varietas yang sudah ada dilakukan secara morfologis. Tetapi karena varietas yang dihasilkan pada umumnya memiliki tetua yang tidak berbeda jauh sehingga secara morfologis susah dibedakan. Apalagi untuk varietas tanaman yang berasal dari spesies dengan keragaman genetik yang sempit, seperti misalnya manggis, hal ini sangat sulit untuk dilakukan. Demikian pula dengan tanaman hias yang diperbanyak secara vegetatif, di mana varietas baru dapat diperoleh dari (i) pemuliaan konvensional melalui persilangan dan seleksi atau (ii) variasi yang terjadi secara spontan atau melalui induksi dari varietas asal.

Sesuai dengan pedoman UPOV No. TG/16/4, untuk uji BUSS varietas tanaman padi, diperlukan pengamatan 99 karakter, baik yang bersifat kualitatif maupun kuantitatif, yang terdapat pada daun, batang, malai, dan biji. Untuk itu, diperlukan keahlian khusus dari pelaksana uji BUSS agar dapat membedakan karakter tersebut pada varietas yang diuji.

Daradjat *et al.* (2004) dalam simulasi uji BUSS varietas padi Fatmawati, dengan mengamati 59 karakter dari 99 karakter yang dianjurkan UPOV, memperoleh hasil sebagai berikut: (a) terdapat sejumlah karakter yang secara unik menjadi pembeda antara varietas unggul tipe baru (VUTB) Fatmawati dengan varietas lain, yaitu warna daun (hijau tua), keberadaan bulu daun (halus kasarnya daun di bawah daun bendera), laju senesen daun, dan lemma mandul yang berwarna merah, dan (b) keseragaman penampilan karakter panjang daun, lebar daun, sudut daun bendera, tebal batang, panjang batang atau tinggi tanaman, panjang malai utama, jumlah malai per rumpun, eksersi malai, panjang lemma mandul, bobot 1.000 butir gabah bernas, panjang gabah, lebar gabah, dan panjang beras pecah kulit relatif kurang seragam.

Selama ini UPOV, organisasi perlindungan varietas tanaman internasional dengan Konvensi UPOV 1978 yang diperbaharui dengan Konvensi UPOV 1991 membedakan varietas baru dengan varietas yang sudah ada menggunakan karakter morfologis. Sampai saat ini UPOV belum merekomendasikan penggunaan teknik molekuler untuk uji BUSS. Meskipun demikian, UPOV terus melakukan pengkajian penggunaan marka molekuler seperti mikrosatelit.

Mikrosatelit (SSR = *simple sequence repeat*) merupakan salah satu marka molekuler yang berupa urutan di-nukleotida sampai tetra-nukleotida yang berulang dan berurutan. SSR merupakan marka genetik yang bermanfaat karena bersifat kodominan, dapat mendeteksi keragaman alel pada tingkat tinggi, serta mudah dan tidak terlalu mahal untuk dianalisis dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR).

SSR telah banyak digunakan untuk keperluan pemuliaan (McCouch *et al.*, 1997; USDA-ARS, 2003), analisis genetik (Rongwen *et al.*, 1995; Olufowote *et al.*, 1997; USDA-ARS, 2003; Saini *et al.*, 2004; Ritschel *et al.*, 2004; Kirst *et al.*, 2005; Thomson *et al.*, 2007), dan untuk perlindungan varietas tanaman (Xie, 2001; De Riek, 2001; Cooke dan Reeves, 2003; Ibanez dan Eeuwijk, 2003).

Mengingat kompleks dan banyaknya karakter yang harus diamati dengan teliti, agar dapat diperoleh perbedaan yang pasti antara varietas yang di-

mintakan perlindungan dengan varietas pembanding, yang tentu saja diperlukan keahlian khusus, maka untuk memudahkan pekerjaan tersebut perlu dicarikan alternatif uji BUSS yang lebih cepat tetapi akurat.

Untuk itu, penelitian ini dimaksudkan untuk menjajagi kemungkinan penggunaan SSR untuk keperluan uji BUSS.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Benih dari 22 tanaman individual varietas padi Fatmawati dan tujuh varietas pembanding yang dinilai paling mirip dengan Fatmawati, yaitu BP68C-MR-4-3-2 (tetua betina) yang untuk singkatnya ditulis BPC, Maros (tetua jantan), Cisadane, BP630, Barumun, Gilirang, dan Memberamo diperoleh dari pemulia Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi.

Penetapan Genotipe SSR

Benih dari tanaman yang akan dianalisis ditumbuhkan dalam pot di rumah kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen). Daun muda diambil dari satu tanaman dari setiap nomor tanaman untuk dianalisis DNA-nya. Hal ini dilakukan untuk mendeteksi heterosigositas dari masing-masing tanaman. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggerus daun di dalam nitrogen cair dalam tabung mikrofuge dengan menambahkan bufer ekstraksi Tris/SDS (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 1,25% SDS (b/v), 0,38 g Na bisulfit per 100 ml bufer), ekstraksi dengan chloroform yang dilanjutkan dengan pengendapan menggunakan etanol. Estimasi konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose, untuk selanjutnya dilakukan pengenceran masing-masing sampel menjadi 5-10 ng/l.

Sepuluh marka mikrosatelit dipilih dari marka yang sebelumnya digunakan untuk analisis diversitas genetik dari *Oryza sativa*, yang terdapat di lebih dari setengah jumlah kromosom padi, terutama yang mengikuti pola mutasi berjenjang (Tabel 1, Garris *et al.*, 2005). Panel multiplex dirancang

untuk menjalankan marka di masing-masing panel berdasarkan kisaran ukuran alel yang telah dipublikasikan (Temnykh *et al.*, 2000). Untuk setiap marka, *forward primer* dilabel dengan salah satu dari tiga label *Xuorescent* (D2, D3, dan D4) untuk dijalankan pada alat Beckman CEQ 8000 menggunakan pewarna WellRED (Proligo, Boulder, CO, USA, IDT, Coralville, IA, USA). Pereaksi PCR mengandung 0,75 U *Fast Start Taq* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) dengan volume reaksi 20 μ l yang berisi: FastStart 10x PCR bufer dengan 2 mM MgCl₂, 10 mM campuran dNTP, 5 μ M primer *forward* dan *reverse*, dan 15-30 ng DNA genom. Pereaksi tersebut dijalankan selama 35 siklus dengan menggunakan program *touchdown PCR* (*touchdown annealing* pada 60-55°C). Masing-masing marka dijalankan pada pereaksi PCR terpisah, dan produk amplifikasinya disatukan sebelum ditempatkan di gel. Kedua panel dioptimasi dengan menyesuaikan dilusi masing-masing produk amplifikasi untuk menyamakan kekuatan signal

dari masing-masing panel. Fragmen dipisahkan berdasarkan ukurannya melalui elektroforesis kapiler menggunakan Beckman CEQ 8000 Genetic Analyzer. Ukuran alel diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak analisis fragmen Beckman, yang diikuti dengan *binning* secara manual untuk marka dengan ukuran alel sedang. Data genotipe marka untuk ketujuh varietas dengan 10 marka mikrosatelit dapat dilihat pada Tabel 1.

Analisis Data

Jumlah alel per lokus, frekuensi alel utama, keragaman genetik, nilai informasi kandungan polimorfisme (PIC = *polymorphism information content*), dan nilai F ditentukan dengan menggunakan PowerMarker versi 3.23 (Liu dan Muse, 2005). Analisis filogenetik dan jarak genetik dilakukan mengikuti cara yang dilakukan oleh Cafalli-Sforza dan Edwards (1967) yang dilanjutkan dengan pembuatan filogeni mengikuti cara yang ada dalam PowerMarker.

Tabel 1. Data sepuluh marka SSR berlabel yang digunakan dalam *multiplexing*.

Panel	Label	Marka	Krom	Motif	Ukuran produk PCR (bp)	Jumlah alel	Ukuran alel jarang (bp)*	Alel utama		PIC
								Ukuran (bp)	Frek (%)	
2	D2 (Hitam)	RM214	7	(CT)14	114-168	4	162	161	57	0.547
2	D3 (Hijau)	RM11	7	(GA)17	122-148	11	124	137	33	0.885
2	D3 (Hijau)	RM144	11	(ATT)11	220-283	5	250	220	48	0.881
2	D4 (Biru)	RM237	1	(CT)18	119-151	8	121	133	41	0.723
2	D4 (Biru)	RM171	10	(GATG)5	321-345	5	321	342	43	0.343
3	D2 (Hitam)	RM133	6	(CT)8	189-233	2	228	227	71	0.593
3	D3 (Hijau)	RM287	11	(GA)21	95-157	5	152	115	66	0.774
3	D4 (Biru)	RM250	2	(CT)17	114-192	3	182	154	67	0.554
3	D3 (Hijau)	RM259	1	(CT)17	120-179	5	162	154	67	0.866
3	D4 (Biru)	RM507	5	(AAGA)7	216-304	3	251	257	91	0.746

* Yang dimaksud alel jarang adalah alel dengan frekuensi <5%.

Tabel 2. Frekuensi alel untuk sampel varietas yang diuji.

Varietas	Jumlah alel	Lokus/alel utama (bp)	Frekuensi (%)	Lokus/alel jarang (bp)	Frekuensi (%)
Fatmawati	33	RM11/139	33	RM214/144	3
BPC	6	RM133/227	30	RM11/139	1.6
		RM287/113		RM144/220	
				RM171/321	
Maros	17	RM11/135	24	RM214/118	5
Cisadane	11	RM237/135	50	RM259/156	9
BP360	16	RM237/129	70	RM144/220	6
Barumun	18	RM11/137	20	RM507/257	5
Gilirang	11	RM11/137	27	RM214/162	9
Memberamo	13	RM11/137	23	RM259/148	7

HASIL DAN PEMBAHASAN

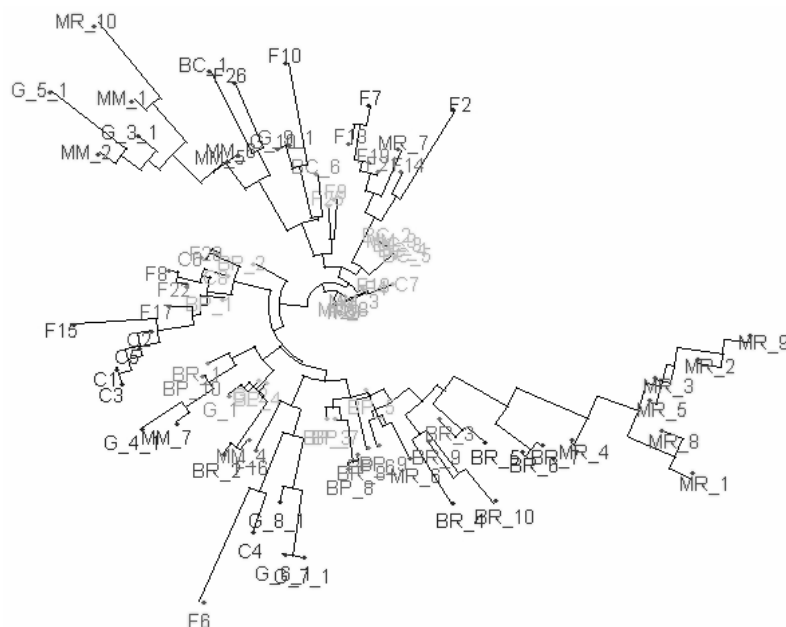
Dengan 10 marka mikrosatelit telah dapat dideteksi sebanyak 125 alel yang tersebar pada kromosom 1, 2, 5, 6, 7, 10, dan 11 dari delapan varietas yang diuji. Sedangkan banyaknya alel dari masing-masing marka mikrosatelit berkisar antara 2 (RM133) dan 11 (RM11) dengan rata-rata 5 alel per mikrosatelit. Nilai PIC berkisar antara 0,343 (RM171) dan 0,885 (RM11) dengan rata-rata 0,691 (Tabel 1). Nilai kisaran ini sama seperti yang diperoleh Thomson *et al.* (2007) dengan 30 marka mikrosatelit. Hal ini menunjukkan bahwa 10 marka mikrosatelit telah cukup untuk memperoleh tingkat polimorfisme yang sama dengan penggunaan 30 marka.

Pembedaan dan Keragaman Varietas

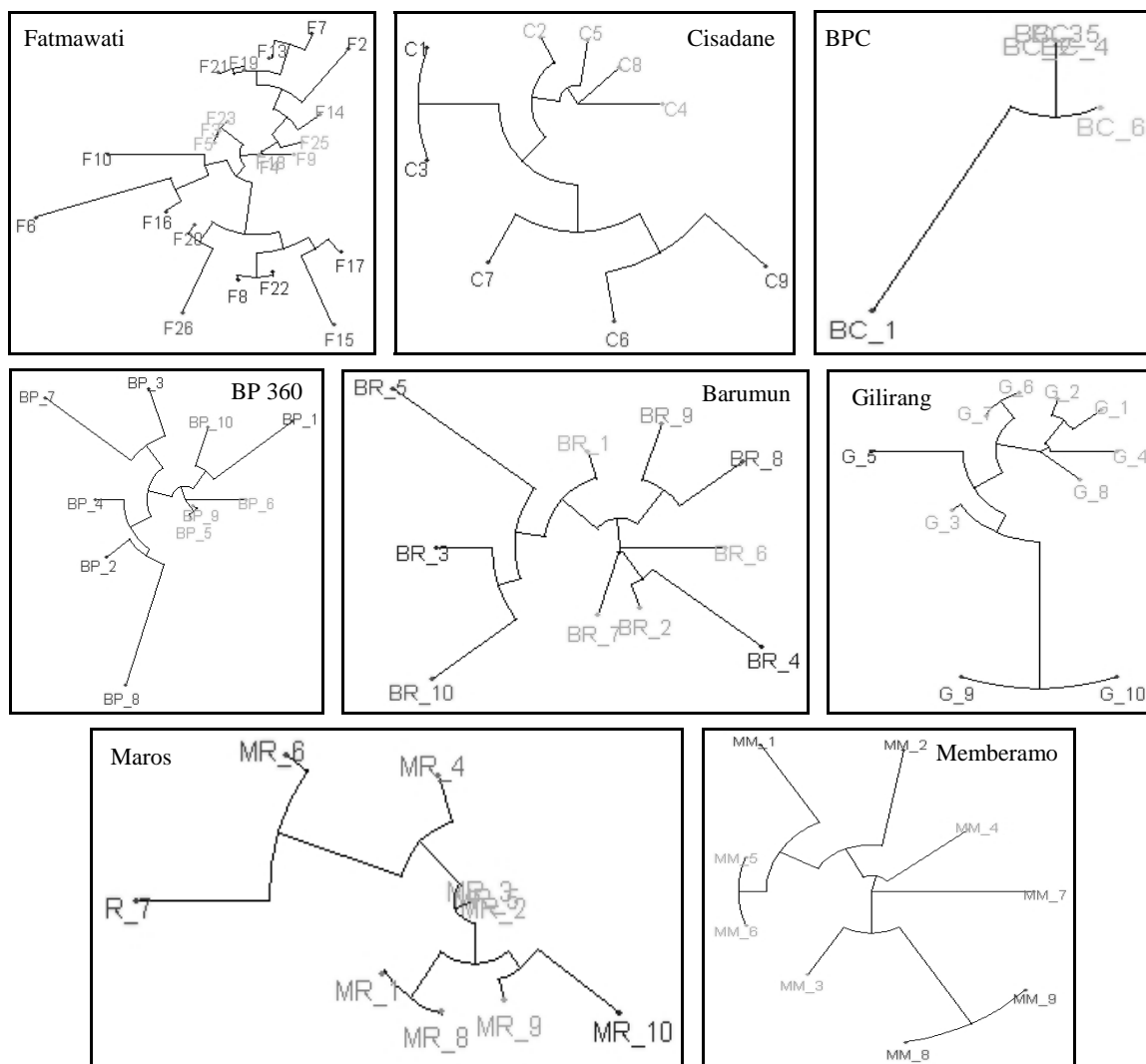
Sepuluh marka mikrosatelit yang digunakan memberikan jumlah alel yang berbeda pada delapan varietas yang diuji. Banyaknya alel berkisar antara 6 (BPC) dan 33 (Fatmawati), di mana Marka RM11 merupakan marka utama yang terdapat pada varietas Fatmawati, Maros, Barumun, Gilirang, dan Memberamo, RM237 pada Cisadane dan BP630, dan marka RM133 dan RM287 pada BPC. Hal ini menunjukkan bahwa marka-marka tersebut merupa-

kan marka yang dapat digunakan sebagai penciri dari varietas yang terkait dengan marka tersebut. Hasil tersebut sesuai dengan penggunaan mikrosatelit pada tanaman hias (De Riek, 2001), pada tanaman anggur (Ibanez dan Eeuwijk, 2003), pada padi (Saini *et al.*, 2004), pada melon (Ritschel *et al.*, 2004) dan pada tanaman hutan (Kirst, 2005). Sedangkan keberadaan alel yang jarang dari setiap varietas yang diuji menunjukkan bahwa varietas tersebut masih beragam.

Pohon keterkaitan telah disusun berdasarkan jarak genetik dari delapan varietas yang diuji (Gambar 1). Selanjutnya terlihat bahwa kelompok populasi varietas menempati posisi yang berbeda, dengan masing-masing varietas populasinya masih terpisah. Meskipun demikian terlihat juga bahwa populasi varietas Fatmawati memiliki sebaran yang paling luas dan menyebar pada klaster yang lainnya. Hal ini menunjukkan besarnya keragaman genetik dari populasi Fatmawati yang diuji. Hal ini akan lebih jelas kalau kita perhatikan Gambar 2 yang menunjukkan bahwa pada umumnya populasi varietas yang diuji, kecuali BPC, masih beragam. Semuanya itu menunjukkan bahwa mikrosatelit tidak hanya dapat digunakan untuk mendeteksi perbedaan antar varietas, tetapi dapat juga digunakan untuk mendeteksi keragaman dalam varietas.



Gambar 1. Gabungan pohon keterkaitan hubungan genetik dari delapan varietas.



Gambar 2. Pohon keterkaitan hubungan genetik populasi delapan varietas uji.

Karakterisasi secara morfologis yang dilakukan oleh Daradjat *et al.* (2004), berdasarkan karakterisasi UPOV, diperoleh sejumlah karakter yang secara unik menjadi pembeda antara VUTB Fatmawati dengan varietas-varietas lain, yaitu warna daun (hijau tua), keberadaan bulu daun (halus kasarnya daun di bawah daun bendera), laju senesen daun, dan lemma mandul yang berwarna merah. Meskipun demikian mereka juga mendapatkan bahwa keseragaman penampilan karakter-karakter panjang daun, lebar daun, sudut daun bendera, tebal batang, panjang batang atau tinggi tanaman, panjang malai utama, jumlah malai per rumpun, eksersi malai, panjang lemma mandul, bobot 1.000 butir gabah

bernas, panjang gabah, lebar gabah, dan panjang beras pecah kulit relatif kurang seragam.

Hasil-hasil di atas menunjukkan bahwa berdasarkan uji BUSS varietas Fatmawati yang secara resmi telah dilepas sebagai varietas padi unggul baru masih belum seragam sehingga secara teoritis tidak dapat diberi perlindungan PVT serta belum layak dilepas sebagai varietas unggul baru.

Pertimbangan ke Depan Pemanfaatan Mikrosatelit untuk Uji BUSS

Uji BUSS yang dilaksanakan melalui pengamatan morfologis 42 karakter kualitatif dan 23 karakter kuantitatif memerlukan kejelian dan keteram-

pilan dari penguji yang terlatih. Untuk melaksanakan uji BUSS harus dilakukan budi daya tanaman yang dimulai dari persiapan tanam sampai panen dengan pengamatan berbagai karakter selama periode itu. Selain waktu (5 bulan) juga biaya yang diperlukan untuk uji BUSS (budi daya, uji laboratorium untuk amilosa, hama dan penyakit, serta pengamatan 59 karakter) tersebut mencapai Rp 34,2 juta (tiga puluh empat juta dua ratus ribu rupiah).

Secara molekuler diperlukan penyiapan bahan tanaman, ekstraksi DNA, dan analisis molekuler yang perlu waktu seluruhnya 1 bulan. Adapun biaya yang diperlukan (primer, bahan kimia, penyiapan DNA, dan pelaksanaan) mencapai Rp 21,5 juta. Tapi berbeda dengan uji BUSS yang dilakukan melalui pengamatan morfologis, fisiologis maupun biokemis dari karakter yang harus diamati, marka ini hanya dapat memberikan perbedaan genetis secara total. Tidak membedakan masing-masing karakter secara molekuler.

Dari hasil penelitian ini maupun hasil penelitian sebelumnya (De Riek, 2001; Ibanez dan Eeuwijk, 2003; Ritschel *et al.*, 2004; Saini *et al.*, 2004; Kirst *et al.*, 2005; Thomson *et al.*, 2007) menunjukkan bahwa marka mikrosatelit dapat digunakan untuk membedakan varietas maupun individu dalam varietas. Hal ini akan sangat penting dalam hal pembuatan varietas turunan esensial (VTE), di mana disebutkan dalam Pasal 14 ayat (5) b Konvensi UPOV Tahun 1991 tentang Konvensi Internasional untuk Perlindungan Varietas Baru Tanaman maupun dalam Pasal 6 ayat (5) a dan b Undang-Undang No. 29 Tahun 2000 tentang Perlindungan Varietas Tanaman yang lebih dirinci lagi dalam Peraturan Pemerintah No. 13 Pasal 2 ayat (3) yang menyatakan bahwa VTE harus mempertahankan ekspresi sifat-sifat esensial dari varietas asal, tetapi dapat dibedakan secara jelas dengan varietas asal dari sifat-sifat yang timbul dari tindakan penurunan itu sendiri. Sifat varietas asal yang harus dipertahankan paling sedikit 70%.

KESIMPULAN

Marka mikrosatelit dapat digunakan untuk mendeteksi perbedaan antar varietas maupun untuk mencirikan varietas, di mana marka RM11 merupa-

kan marka utama yang terdapat pada varietas Fatmawati, Maros, Barumun, Gilirang, dan Memberamo, RM237 pada Cisadane dan BP630, dan marka RM133 dan RM287 pada BPC.

Baik secara morfologi maupun secara molekuler terbukti bahwa kedelapan varietas yang diuji masih belum seragam. Khusus untuk varietas Fatmawati yang dijadikan varietas simulasi uji BUSS, hasil tersebut menunjukkan bahwa varietas Fatmawati keragamannya masih tinggi sehingga tidak dapat diberi perlindungan PVT dan belum layak dilepas sebagai varietas unggul baru, karena masih belum seragam.

Atas dasar pertimbangan waktu, biaya, dan ketelitian, marka mikrosatelit dapat diusulkan sebagai alternatif uji BUSS di masa depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dr. Dwinita W. Utami atas bantuan pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Cafalli-Sforza, L.L. and A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19:233-257.
- Cooke, R.J. and J.C. Reeves. 2003. Plant genetic resources and molecular markers: Variety registration in a new era. *Plant Genetic Resources* 1:81-87.
- Daradjat, A.A., N. Yunani, Indrastuti A. Rumanti, Y. Widyastuti, I.W. Mulsanti, and L. Murdiani. 2004. Report on the Simulation of DUS Test (Distinct, Uniform and Stable) of Improved Variety Fatmawati. Balitpa Sukamandi and Pusat PVT.
- De Riek, J. 2001. Are Molecular Markers Strengthening Plant Variety Registration And Protection? *ISHS Acta Horticulturae* 552: XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Strategies for New Ornamentals-Part I. Melle, Belgium, July 2001.
- Garris, A.J., T.H. Thai, S. Kressovich, and S.R. McCouch. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169:1631-1638.
- Ibanez, J. and F.A. Eeuwijk. 2003. Microsatellite Profiles As a Basis for Intellectual Property Protection in Grape. *ISHS Acta Horticulturae* 603: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding. Kecskemet, Hungary, April 2003.

- Kirst, M., C.M. Cordeiro, G.D.S.P. Rezende, and D. Grattapaglia. 2005. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. *J. Heredity* 96(2):161-166.
- Liu, K. and S.V. Muse 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21(9):2128-2129.
- McCouch, S.R., X. Chen, O. Panoud, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii, and B. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 35(1-2):89-99.
- Olufowote, J.O., Y. Xu, X. Chen, W.D. Park, H.M. Beachell, R.H. Dilday, M. Goto, and S.R. McCouch. 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 40:370-378.
- Peraturan Pemerintah No. 13. 2004. Penamaan, Pendaftaran dan Penggunaan Varietas Lokal untuk Pembuatan Varietas Turunan esensial.
- Ritschel, P.S., T.C. de Lima Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso, and M.E. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biol.* 4:9.
- Rongwen, J., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat, U. Lavi, and P.B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90(1):43-48.
- Saini, N., S. Jain, R.K. Jain, P. Siwach, and V.K. Chowdhury. 2004. Allelic diversity among Basmati and non-Basmati long-grain indica rice varieties using microsatellite markers. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 13(1):25-32.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii, and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- Thomson, M.J., E.M. Septiningsih, F. Suwardjo, T.J. Santoso, T.S. Silitonga, and S.R. McCouch. 2007. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 114(3):559-568.
- Undang-undang No. 29, 2000. Tentang Perlindungan Varietas Tanaman.
- UPOV. 1991. International Convention for the Protection of New Varieties of Plants.
- USDA-ARS. 2003. Development and Utilization of Simple Sequence Repeat (SSR) Molecular Markers for the Improvement of Alfalfa and Related Species. 2003 Annual Report.
- Xie, F.M. 2001. Inbred rice lines A0044 and B0044. United States Patent 6294717. US Patent Issued on September 25, 2001.